

[ 文章编号 ] 1007-3949(2016)24-02-0141-04

· 实验研究 ·

# 网膜素改善氧化应激对人动脉血管平滑肌细胞 I 、IV型胶原表达的抑制作用

郑辉<sup>1</sup>, 刘慧娟<sup>2</sup>, 葛焕琦<sup>1</sup>, 张春风<sup>1</sup>, 胡睿<sup>1</sup>, 李雪粉<sup>1</sup>

(1. 泰达国际心血管病医院内分泌科, 2. 天津国际生物医药联合研究院, 天津市 300457)

[ 关键词 ] 网膜素; 人主动脉平滑肌细胞; 氧化应激; I 型胶原; IV型胶原

[ 摘 要 ] 目的 研究网膜素对氧化应激作用下的人主动脉平滑肌细胞胶原 I 、IV 表达的影响。方法 将人主动脉平滑肌细胞系培养, 细胞密度到达 90% 以上后, 随机分为 5 组: 对照组、氧化应激组、网膜素组、细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 抑制剂组和丝裂原活化蛋白激酶 (p38MAPK) 抑制剂组。其中, 对照组不增加任何处理, 氧化应激组加入叔丁基氢过氧化物 (t-BHP, 87.1 μmol/L), 网膜素组 (87.1 μmol/L t-BHP + 600 μg/L 网膜素)、ERK 抑制剂组、p38MAPK 抑制剂组为在网膜素组基础上分别加入 ERK 抑制剂 (PD98059, 60 μmol/L) 和 p38MAPK 抑制剂 (SB203580, 100 μmol/L), 应用 Western blot 法检测细胞中胶原 I 、IV 表达量。结果 应用 MTT 法, 筛选 t-BHP 最佳作用浓度为 87.1 μmol/L; 与对照组相比, 氧化应激组人动脉平滑肌细胞内 I 、IV 型胶原表达显著下降 ( $P < 0.01$ ); 与氧化应激组比较, 网膜素组 I 、IV 型胶原表达显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与网膜素组比较, ERK 抑制剂组和 p38MAPK 抑制剂组 I 、IV 型胶原表达均显著下降 ( $P < 0.05$ )。结论 网膜素能改善氧化应激对人动脉平滑肌细胞 I 、IV 型胶原表达抑制的作用, 可能通过此机制促进动脉粥样硬化斑块的稳定, ERK/p38MAPK 途径可能参与网膜素的信号传导。

[ 中图分类号 ] R96

[ 文献标识码 ] A

## Omentin Attenuates Oxidative Stress-induced Down-regulation of I / IV Collagen in the Human Aortic Smooth Muscle Cells

ZHENG Hui<sup>1</sup>, LIU Hui-Juan<sup>2</sup>, GE Huan-Qi<sup>1</sup>, ZHANG Chun-Feng<sup>1</sup>, HU Rui<sup>1</sup>, and LI Xue-Fen<sup>1</sup>

(1. Department of Endocrine, TEDA International Cardiovascular Disease Hospital, Tianjin 300457, China; 2. Tianjin International Joint Academy of Biotechnology &amp; Medicine, Tianjin 300457, China)

[ KEY WORDS ] Omentin; Human Arterial Smooth Muscle Cells; Oxidative Stress; Type I Collagen; Type IV Collagen

[ ABSTRACT ] **Aim** To study the influence of omentin on the expression of collagen I / IV in the human aortic smooth muscle cells subjected to oxidative stress. **Methods** Human aortic smooth muscle cells were cultured in vitro. When cell density reached above 90%, cells were randomly divided into 5 groups: control group, oxidative stress group, omentin group, ERK (extracellular regulated protein kinases) inhibitor group and p38MAPK (p38 mitogen-activated protein kinases) inhibitor group. Among them, the control group did not receive any treatment, oxidative stress group were treated with tert-butyl hydroperoxide (t-BHP, 87.1 μmol/L) to simulate the state of oxidative stress; omentin group were treated, except for 87.1 μmol/L t-BHP, with 600 μg/L omentin; except for t-BHP (87.1 μmol/L) and omentin (600 μg/L), ERK inhibitors (PD98059, 60 μmol/L) and p38MAPK inhibitors (SB203580, 100 μmol/L) were used in ERK inhibitor group and p38MAPK inhibitor group respectively. The expression of collagen I / IV were detected by Western blot hybridization. **Results** MMT method was used to screen the optimal concentration and the best action time of t-BHP.

(1) The optimal concentration was 87.1 μmol/L; (2) Compared with the control group, the expression of collagen I / IV in human aortic smooth muscle cells in oxidative stress group decreased significantly ( $P < 0.01$ ); (3) Compared with the oxidative stress group, the expression of type I / IV collagen in human aortic smooth muscle cells increased significantly in

[ 收稿日期 ] 2015-02-26

[ 修回日期 ] 2015-05-11

[ 基金项目 ] 天津市滨海新区卫生局科技项目 (2013BWK2006)

[ 作者简介 ] 郑辉, 硕士, 副主任医师, 从事糖尿病与动脉粥样硬化发生机制的研究, E-mail 为 zhui0123@163.com。刘慧娟, 硕士, 主要从事生物化学研究。通讯作者葛焕琦, 主任医师, 教授, 从事糖尿病及其发病机制的研究, E-mail 为 zhui0123@163.com。

omentin group ( $P < 0.01$ ); (4) Compared with the omentin group, the expression of collagen I/IV in ERK inhibitor group and p38MAPK inhibitor group were decreased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Omentin could improve oxidative stress-induced down-regulation of I/IV collagen in the human aortic smooth muscle cells, and probably promote the stabilization of atherosclerotic plaque through the mechanism. ERK/p38MAPK signaling pathway may be involved in omentin effect in vivo.

网膜素作为新的脂肪因子,它表达的下调是冠心病的独立危险因素<sup>[1]</sup>。近期临床研究发现在急性心肌梗死的急性期血清网膜素水平下降,经过6个月随访发现它的表达水平升高,可能成为新的预防急性心肌梗死的靶点<sup>[2]</sup>。推测网膜素可能是抗动脉粥样硬化斑块形成的重要因子。构成动脉粥样硬化斑块尤其是纤维帽的主要成分是细胞外基质,血管平滑肌细胞合成细胞外基质减少是斑块破裂的内在主要原因<sup>[3]</sup>。I型、Ⅲ型胶原、弹力纤维以及蛋白多糖是细胞外基质的主要成分,赋予纤维帽稳定性,Ⅳ型胶原是粥样斑块基底膜的主要成分。氧化应激能诱导血管平滑肌细胞表型从收缩型转变为合成型,进而促进血管平滑肌细胞的迁移和增殖,有研究表明氧化应激能抑制I型胶原的表达,对Ⅳ型胶原的作用尚不清楚。本研究旨在阐明网膜素对氧化应激作用下的人动脉血管平滑肌细胞胶原I、Ⅳ表达的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器

凝胶成像分析系统(SAGECREATION公司),倒置显微镜(日本Olympus公司),JY600C通用型电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司)。

### 1.2 试剂

Collagen I、Ⅳ兔多克隆抗体(美国R&D公司),人重组网膜素(美国prospec公司),叔丁基氢过氧化物(tert butyl hydroperoxide, T-BHP, 美国sigma公司),人动脉平滑肌细胞系(human aortic-vascular smooth muscle cells, HA-VSMC 来自美国ATCC的, 货号CRL-1999),羊抗兔(二抗)(美国R&D公司),PD98059(美国Selleck公司),SB203580(美国Selleck公司),其他试剂均为分析纯标准。

### 1.3 实验分组

购买的HA-VSMC细胞系,用1640培养基加10%胎牛血清37℃下CO<sub>2</sub>培养箱中培养,约80%汇合时消化,每孔密度 $5 \times 10^8$ 个/L细胞接种于9孔板,细胞密度到达90%以上后,HA-VSMC细胞随机分为5组:对照组(仅加入新鲜血浆,不添加t-BHP和网膜素)、氧化应激组(t-BHP处理)、网膜素组(t-

BHP + 600 μg/L 网膜素)、ERK抑制剂组(t-BHP + 600 μg/L 网膜素 + 60 μmol/l PD98059)及p38MAPK抑制剂组(t-BHP + 600 μg/L 网膜素 + 100 μmol/l SB203580),每组3孔,同时进行干预实验,进行干预后,细胞放置在冰上,去除培养基,用PBS清洗细胞两遍,吸除PBS。每个小皿中加60 μL的2×裂解缓冲液裂解细胞。利用细胞刮刮取细胞裂解液于1.5 mL EP管中,金属浴中煮样20~30 min,应用Western blot法测胶原I/IV蛋白表达。每孔读取3次数据,计算平均值作为该孔的读数,再将每组3孔的数据取平均值作为该组的最终数据。

### 1.4 利用Western blot法测定人主动脉平滑肌细胞I、Ⅳ型胶原表达

根据目的蛋白的分子量大小配置相应的蛋白胶。样品进行上样,每个孔中加入350 μg的蛋白样品。上层胶恒压180 V,下层胶恒压220 V进行跑胶,100 min左右(此处为了缩短实验时间而增加了电压)。转膜:将目的蛋白所在位置的胶切下,120 mA恒流进行转膜70 min。封闭:利用5%的脱脂奶粉在杂交袋中进行封闭(4℃过夜)。再分别用胶原I、Ⅳ一抗(1:2000)孵育1 h左右。用TBST进行洗膜,5 min一次,一共洗5次。在与二抗(1:2000)孵育50 min左右。

TBST洗膜:用TBST进行洗膜,5 min一次,一共洗5次。曝光:在暗盒上铺保鲜膜,滴上底物,将PVDF膜放在底物上,保鲜膜盖上,放上胶片,盖上暗盒。之后将胶片放在显影液,定影液,水中冲洗,得到所需胶片。利用软件分析条带灰度值。

### 1.5 数据处理

所有数据均应用SPSS 19.0进行统计分析,各实验组数据均以实际测定的灰度值与内参GAPDH的比值用 $\bar{x} \pm s$ 表示,并根据资料性质分别进行 $\chi^2$ 检验、方差分析,多组间的两两比较进行LSD检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 T-BHP最适作用浓度的筛选

利用噻唑蓝[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]比色法进行最适t-

BHP 作用浓度的筛选。将体外培养 HA-VSMC 细胞,铺 96 孔板,每孔 5000 个细胞,48 h 后加入不同浓度的 t-BHP,共设定 10 个浓度,0,12.5  $\mu\text{mol/L}$ ,18.75  $\mu\text{mol/L}$ ,25  $\mu\text{mol/L}$ ,37.5  $\mu\text{mol/L}$ ,50  $\mu\text{mol/L}$ ,75  $\mu\text{mol/L}$ ,100  $\mu\text{mol/L}$ ,150  $\mu\text{mol/L}$ ,200  $\mu\text{mol/L}$ ,每个浓度 6 个重复,分别作用 6 h。然后向 96 孔中加入 25  $\mu\text{L}$  5×的 MTT,4 h 后吸除每个孔中的 MTT,加入 150  $\mu\text{L}$  的 DMSO,析出蓝紫色的甲臜,利用酶标仪进行测量 492 nm 的吸光光度值。细胞的存活率分别为 100%  $\pm$  0%、118.9%  $\pm$  4.2%、121.2%  $\pm$  9.4%、118.6%  $\pm$  5.7%、123.7%  $\pm$  9.0%、127.0%  $\pm$  5.1%、88.5%  $\pm$  1.7%、52.5%  $\pm$  1.5%、35.8%  $\pm$  1.6% 和 27.7%  $\pm$  3.0%,根据浓度及存活率作趋势图,计算出  $\text{IC}_{50} = 87.13 \pm 4.78$  ( $P < 0.05, r = -0.905$ ) 因此最终选择浓度 87.1  $\mu\text{mol/L}$  作用 6 h 作为 t-BHP 对 HA-VSMC 作用的最佳浓度。以后所有的实验均以此实验条件为基础。

## 2.2 网膜素能促进氧化应激状态下的人主动脉平滑肌细胞 I、IV型胶原表达的上调

与对照组相比,氧化应激组细胞内 I、IV型胶原含量显著降低 ( $P < 0.05$ ),而加入网膜素后 I、IV型胶原含量显著升高,超过或者接近对照组 ( $P < 0.05$ ;表 1、图 1 和图 2)。I、IV型胶原在人主动脉平滑肌细胞中均有一定数量的表达;与对照组相比在氧化应激状态下,I、IV型胶原表达受到抑制;网膜素促进人主动脉平滑肌细胞在氧化应激状态下 I、IV型胶原表达恢复至接近对照组水平,网膜素有改善氧化应激对人动脉血管平滑肌细胞胶原 I、IV表达的抑制的作用。

表 1. 网膜素对氧化应激状态下的人主动脉平滑肌细胞 I、IV型胶原表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1. Effect of omentin on expression of collagen I/IV in cultured human aortic smooth muscle cells to oxidative stress ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

分组	I型胶原	IV型胶原
对照组	0.53 $\pm$ 0.01	0.22 $\pm$ 0.01
氧化应激组	0.35 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.14 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
网膜素组	0.58 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.19 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.01$ ,与对照组比较;b 为  $P < 0.01$ ,与氧化应激组比较。

## 2.3 加入阻断剂后网膜素对氧化应激状态下人主动脉平滑肌细胞内胶原表达上调的作用减弱

在网膜素作用下的氧化应激状态下的人主动脉平滑肌细胞中加入 ERK 阻断剂后,与网膜素组相比,在胶原 I 含量无显著差异,胶原 IV 含量明显下降,与 t-BHP 组差异无显著差异。加入 P38MAPK 阻断剂后,

与网膜素组相比,胶原 I、胶原 IV 含量均显著下降 ( $P < 0.05$ ;表 2、图 3 和图 4)。结果表明 ERK/p38MAPK 途径可能参与了网膜素的作用通路。

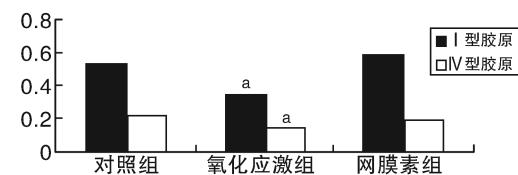


图 1. 网膜素对氧化应激状态下的人主动脉平滑肌细胞 I、IV型胶原表达的影响。a 为  $P < 0.01$ ,与网膜素组比较。

Figure 1. Effect of omentin on expression of collagen I/IV in cultured human aortic smooth muscle cells to oxidative stress

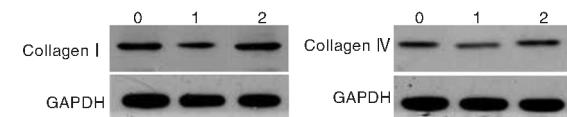


图 2. 网膜素对氧化应激状态下人主动脉平滑肌细胞胶原表达的影响 0 为对照组,1 组为氧化应激组,2 为网膜素组。

Figure 2. Effect of omentin on expression of collagen I/IV in cultured human aortic smooth muscle cells to oxidative stress

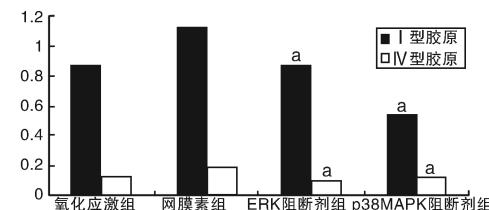


图 3. 加入 ERK 阻断剂和 P38MAPK 阻断剂后网膜素对氧化应激状态下人主动脉平滑肌细胞内胶原表达的影响 a 为  $P < 0.05$ ,与网膜素组比较。

Figure 3. In cultured human aortic smooth muscle cells which were treated with ERK and P38MAPK inhibitor PD98059 and SB203580, effect of omentin on expression of collagen I/IV to oxidative stress

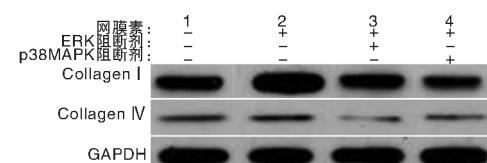


图 4. 加入阻断剂后网膜素对氧化应激状态下人主动脉平滑肌细胞内 I、IV型胶原表达的影响 1 为氧化应激组,2 为网膜素组,3 为加入 ERK 阻断剂组,4 为加入 P38MAPK 阻断剂组。- 为未加入该物质, + 为加入该物质。

Figure 4. In cultured human aortic smooth muscle cells which were treated with ERK and P38MAPK inhibitor PD98059 and SB203580, effect of omentin on expression of collagen I/IV to oxidative stress

表 2. 加入 ERK 阻断剂和 p38MAPK 阻断剂后网膜素对氧化应激状态下人主动脉平滑肌细胞内胶原表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2. In cultured human aortic smooth muscle cells which were treated with ERK and P38MAPK inhibitor PD98059 and SB203580, effect of omentin on expression of collagen I / IV to oxidative stress ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

分组	I型胶原	IV型胶原
氧化应激组	0.87 $\pm$ 0.05	0.13 $\pm$ 0.01
网膜素组	1.13 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	0.18 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
ERK 阻断剂组	0.78 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.10 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>
p38MAPK 阻断剂组	0.54 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.12 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与网膜素组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与氧化应激组比较。

### 3 讨 论

尽管动脉粥样斑块破裂可能造成血管阻塞,但大部分破裂的斑块可以自行修复而不产生临床症状。修复过程中伴随着血管平滑肌细胞侵入并增殖,合成胶原基质;修复的效果决定了斑块是否有继续破裂的危险<sup>[4]</sup>。氧化应激是动脉粥样硬化斑块破裂的重要外在原因,它能够抑制平滑肌细胞的功能,促进其凋亡,减少胶原基质的合成,导致纤维帽变薄,斑块破裂不能自行修复。本研究发现,应用 t-BHP 模拟氧化应激状态,当 t-BHP 作用于正常人主动脉平滑肌细胞时,与对照组比较,细胞内 I、IV型胶原的表达显著下降,而加入网膜素后, I、IV型胶原的表达上调,这一上调作用能被 ERK/p38MAPK 阻断剂抑制,ERK/P38MAPK 可能参与了网膜素细胞内的作用。

网膜素(omentin)是一个新近发现的脂肪因子,大量的临床研究发现,网膜素与冠状动脉粥样硬化形成密切相关,它表达的下调是冠状动脉粥样硬化性心脏病的独立危险因素<sup>[5]</sup>。在急性冠脉综合症患者较稳定心绞痛患者血清中网膜素 1 水平显著下降<sup>[1]</sup>。Greulich 等<sup>[6]</sup>人基于临床及基础研究发现网膜素 1 是心血管保护的脂肪因子,然而网膜素抗粥样硬化的机制尚不明确。I型胶原主要聚合成粗纤维,是纤维帽的主要成分,IV型胶原为基底膜胶原,为组成斑块基底部的成分。氧化应激状态引起二者的含量下降表明动脉平滑肌细胞的修复能力下降。本研究通过 Western blot 方法测定胶原表达量,发现存在氧化应激的状态下,加入网膜素后能够促进动脉平滑肌细胞内胶原含量增加接近正常对照组,尤其是胶原 I 的合成。胶原含量的增加能够确

保动脉粥样斑块的稳定性,减少斑块破裂事件发生。本研究也首次观察了网膜素与氧化应激作用的相互关系,它可能通过上调动脉平滑肌细胞内胶原表达的机制,阻止氧化应激引起的斑块破裂。

在网膜素在细胞内的信号传导通路尚不明确。目前尚无网膜素逆转氧化应激作用的分子机制。Kazama 等<sup>[7]</sup>的研究表明网膜素(300  $\mu$ g/L, 30 min)能够通过 p38MAPK 途径拮抗炎症因子的作用。在本研究中,分别加入 ERK 和 p38MAPK 阻断剂后,网膜素对 I、IV型胶原表达得上调作用减弱, I、IV型胶原表达下降,接近未加入网膜素的氧化应激组的水平。表明网膜素促进平滑肌细胞产生胶原的作用消失,过 ERK/p38MAPK 信号传导通路可能参与了网膜细胞内信号传导,仍需进一步研究。

综上所述,本研究发现网膜素能逆转氧化应激所致的人主动脉平滑肌细胞胶原含量减少的作用,增加平滑肌细胞产生胶原,这有利于在动脉粥样斑块内的修复,并初步探讨了其作用的信号传导通路。将为冠状动脉粥样硬化的治疗,提供新的治疗方向。

### [参考文献]

- [1] Zhong X, Zhang HY, Tan H, et al. Association of serum omentin-1 levels with coronary artery disease [J]. Acta Pharmacol Sin, 2011, 32(7): 873-878.
- [2] Kadoglou NP, Tahmatzidis DK, Giannakoulas C, et al. Serum levels of novel adipokines, omentin-1 and chemerin, in patients with acute myocardial infarction: KOZANI STUDY [J]. J Cardiovasc Med, 2015, 16(5): 341-346.
- [3] 郭爱桃. 冠状动脉粥样硬化斑块组成成分与斑块破裂的关系 [J]. 中国动脉硬化杂志, 1999, 7(4): 357-359.
- [4] 庄瑜, 刘俊, 肖明, 等. 血管平滑肌细胞在动脉粥样硬化的作用 [J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(17): 3375-377.
- [5] Shibata R, Ouchi N, Kikuchi R, et al. Circulating omentin is associated with coronary artery disease in men [J]. Atherosclerosis, 2011, 219(2): 811-814.
- [6] Greulich S, Chen WJ, Maxhera B, et al. Cardioprotective properties of omentin-1 in type 2 diabetes: evidence from clinical and in vitro studies [J]. PLoS One, 2013, 8(3): e59 697.
- [7] Kazama K, Usui T, Okada M, et al. Omentin plays an anti-inflammatory role through inhibition of TNF- $\alpha$ -induced superoxide production in vascular smooth muscle cells [J]. Eur J Pharmacol, 2012, 686(1-3): 116-123.

(此文编辑 李小玲)